

Pseudozyma属によるバイオ界面活性剤の生産と用途開拓

森田 友岳

界面活性剤は国内だけでも年間100万トン以上生産され、さまざまな産業に利用されている¹⁾。その機能は、乳化・分散、洗浄、起泡・消泡、湿潤・浸透、防錆、均染・固着、帯電防止と幅広く、現在6000品目以上が用途に応じて使い分けられている。石鹼やレシチン、サポニンなども動植物を原料とする界面活性剤として利用されているが、現在、界面活性剤のほとんどは石油由来である。一方、化学物質拡散リスクの低減や石油使用量削減といった観点から、より環境に調和した界面活性剤の開発が望まれており、天然成分を原料とする界面活性剤が大きな注目を集めている。特に、微生物が生産する界面活性剤はバイオサーファクタント(バイオ界面活性剤、以下BS)と呼ばれ²⁻⁴⁾、生分解性や安全性だけでなく、物性や機能も優れた機能性バイオ素材として幅広い産業への応用が期待されている。

バイオ界面活性剤

BSは、親水基の構造で大きく4種類(1. 糖型, 2. 脂肪酸型, 3. ペプチド型, 4. 高分子型)に分類され、数十種類のもが知られている。BSは細胞内の酵素反応で立体選択的に生合成されるため、分子の形と向きが揃っており、界面で効率よく分子集合や配向することができる。そのため、BSは合成界面活性剤に比べて低濃度で界面活性を発現し、さらに親水基と疎水基の組合せによってさまざまな生理活性を発揮することができる。

すでに実用化されているものもあり、たとえば、酵母が生産する糖型BSであるソホロリピッドは、洗浄力が高いことに加えて起泡性が低いという特徴を生かし、食器洗浄機用洗浄剤として商品化されている(サラヤ株式会社)。同じく酵母が生産する糖型BSであるマンノシルエリスリトールリピッド(MEL, 図1)は、最近、セ

ラムド様の保湿効果や毛髪修復作用などの実用特性を示すことが明らかになり、スキンケア化粧品に応用されている(東洋紡株式会社)。また、枯草菌が生産するペプチド型BSであるサーファクチンは、強い乳化能と優れた皮膚特性を生かして、スキンケア素材に利用されている(株式会社カネカ)。

MEL生産菌のスクリーニング

BSの分子内には多くの不斉炭素が存在するため化学合成は困難だが、微生物は適正な条件で培養するだけでBSを生産するため、BSを実用化するためには、BS生産菌のスクリーニングや育種・改良による生産効率の向上および構造・機能の拡充が不可欠である。BS生産菌を新たに取得する方法としては、自然界から微生物をスクリーニングする方法と、公的保存機関(日本のNBRCやJCM, 米国のATCCなど)に登録されている菌株を活用する方法がある。BS生産菌のスクリーニングは、原料に油脂や炭化水素類を用いて行われてきた。この場合、BSが生産されると原料の乳化によって培養液が白濁するため、肉眼でBS生産菌の存在を判断することができる。実際に、大豆油を炭素源としたスクリーニングによって、葉面などに常在する担子菌酵母*Pseudozyma antarctica*が、MEL量産菌として単離されている。

最近、スクリーニング方法が改良され、BS生産菌をより迅速かつ効率よく取得することが可能になっている。採取した試料の集積培養や得られたコロニーの培養はグルコースを炭素源として行い、培養液を疎水性フィルム(パラフィルム)上に滴下するだけで、液滴の形状からBSの生産を目視判定できるという、簡便なスクリーニング方法である。この方法で、環境中からたくさんのMEL生産菌を取得することに成功し、MEL-AだけではなくMEL-BやMEL-Cの選択的な量産が可能になった。さらに、得られたMEL生産菌の分類同定によって、すべての菌株が*Pseudozyma*属の酵母であることが分かったため、公的機関に保存されている*Pseudozyma*属の菌株(15種)を使ってMELの生産性を調べたところ、*P. rugulosa*, *P. parantarctica*, *P. graminicola*, *P. siamensis*など、合計12種以上の菌株がMELを生産す

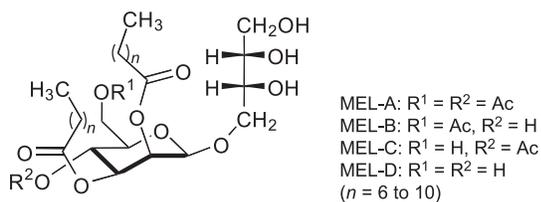


図1. マンノシルエリスリトールリピッド(MEL)の構造

著者紹介 国立研究開発法人 産業技術総合研究所 機能化学研究部門(上級主任研究員) E-mail: morita-tomotake@aist.go.jp

ることが明らかになった。このように、スクリーニング技術が向上したことでこれまで発見できなかったMEL生産菌の取得に成功し、*Pseudozyma*属がMEL生産酵母であることが分かっただけでなく、MEL生産効率の向上や構造・機能の拡充といった、実用化に向けた研究も加速されることとなった。

***Pseudozyma*属によるMELの生産**

*Pseudozyma*属のほとんどの菌株は、MEL生産性が非常によく、MELを商業生産するための高いポテンシャルを有している。たとえば、*P. antarctica*, *P. aphidis*, *P. rugurosa*などは、植物油を原料として100 g/L以上のMEL (主成分はMEL-A)を生産し、*P. hubeiensis*や*P. siamensis*を使えば、MEL-Cを主成分とするMELを数十g/L以上生産することができる(図2)。さらに、培養条件を工夫することで、脂肪酸の数異なる三鎖型MELや一鎖型MELの生産も可能である。また、培養液中に過剰量の糖アルコールを添加することで、マンノシルマンニトールリピッドやマンノシルアラビトールリピッドといったMEL同族体の生産にも成功している。このように生産菌と培養条件を工夫して組み合わせることで、さまざまな構造と機能を持つMELあるいは同族体を生産できるようになってきている。すべての種類を大量生産するためには、製造技術の更なる革新が必要であるが、ここまで述べてきた古典的な手法に、遺伝子組換え技術を適用することでブレークスルーが期待される。

MELの生合成経路

MELの生合成遺伝子は、トウモロコシ黒穂病菌である*Ustilago maydis*で最初に同定され、*Pseudozyma*属も同様の遺伝子を保存していることが分かっている^{5,6}。

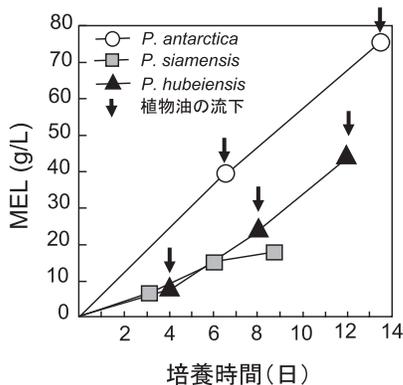


図2. *Pseudozyma*属によるMELの生産

マンノシルトランスフェラーゼ (Emt1) によってGDPマンノースとエリスリトールが結合して糖骨格 (マンノシルエリスリトール, ME) が生成され、アシルトランスフェラーゼ (Mac1, Mac2) によってMEに脂肪酸が結合してMEL-Dが形成される。さらに、アセチルトランスフェラーゼ (Mat1) によってアセチル化されてMEL-A, MEL-B, MEL-Cとなり(図3), 菌体外に分泌されると考えられている。

近年の技術革新によって、これまでモデル生物にほぼ限定されていた遺伝子レベルでの研究を、*Pseudozyma*属のような産業酵母を対象として実施することが可能になっている。すでに、*Pseudozyma*属のゲノム情報も公開され始め⁷, 遺伝子組換え技術の基盤も整備されてきている。MEL生合成経路の研究を中心に蓄積された遺伝子の機能解析も含め、今後、*Pseudozyma*属の遺伝子情報の利活用が広がれば、新たな産業酵母の開発に貢献できると考えられる。

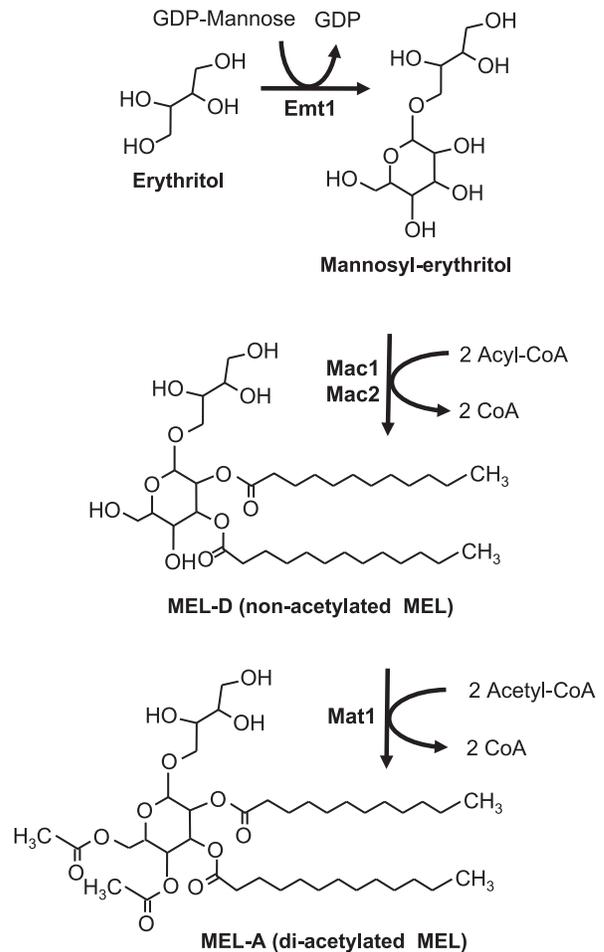


図3. MEL生合成経路

MELの物性と機能

MELの臨界ミセル濃度 (cmc) は非常に低く (2.7×10^{-6} M), かつ強い界面活性作用を示し, cmcでの表面張力は30 mN/m以下まで低下する²⁾. また, MELの大豆油や炭化水素類に対する乳化能は, 代表的な糖型の合成界面活性剤であるシヨ糖脂肪酸エステルやポリオキシエチレン-ソルビタン脂肪酸エステルに比べて数倍以上となる.

また, MELは, 水溶液中で特異な自己集合特性示すことも知られている. MEL-A (1 mM) の薄膜を水和させると, 直径1~20 μm の油滴状の構造体を形成し, 透過電子顕微鏡観察や小角X線散乱法によって, スポンジ相 (二分子膜がランダムに連結してできる三次元ネットワーク) であることが確認されている. MEL-Aよりもアセチル基が一つ少ないMEL-Bは, スポンジ相ではなく直径10~20 μm の巨大リポソーム (ラメラ相) を形成する. すなわち, マンノース上の水酸基あるいはアセチル基の状態によって自己組織化の方向が決まり, スポンジ相 (ランダム構造) やラメラ相 (秩序化構造) を形成していると考えられている. MELは, このような液晶を, 幅広い濃度域, 温度域で形成可能であり, 既存の界面活性剤や脂質とは大きく異なる特性を有する.

MELの化粧品への応用

天然セラミドは, 優れた保湿効果を示すスキンケア素材として利用されているが, 動植物を原料としているため高価である. そのため, セラミド類と同等以上の保湿効果を示し, 安全で安価な素材の開発が求められていた.

MELは, 分子内に糖と糖アルコールから成る二糖および脂肪酸を同時に含有しており, 分子モデリングの結果から, 天然セラミドと構造が類似していると予測された. さらに, セラミドと同等の保湿効果を有する可能性が, ヒト三次元皮膚モデル (テストスキン) を活用した実験で示され, MELをスキンケア素材として応用するための取組みが加速された⁴⁾.

またMELは, 酵母の培養液中に蓄積されるので高純度品の調製が容易であり, 植物からの天然セラミドの抽出や, 化学的な天然あるいは疑似セラミドの合成に比べ, 製造コストは5分の1から10分の1以下になると考えられる. また, 石油由来の原料をまったく使わず, 微生物の培養によってバイオマスから一段階で製造でき, さ

に化学合成に比べて低環境負荷な製造プロセスである点からも, MELは, 環境負荷の低い高機能バイオ素材として期待された.

このようにMELは, これまでの天然系保湿剤と同等の特性を有することに加えて, 微生物プロセスで環境に大きな負荷をかけずに大量製造できることがポイントとなり, 新しいスキンケア素材としての実用化に至った.

今後の展望

BSは, 合成界面活性剤にはない優れた物性・機能を発揮するため, 界面活性剤としてだけでなく, 機能性バイオ素材として幅広い産業分野への応用が期待されている. バイオ素材の製造コストは, 石油からの化学合成品に比べると高くなるが, 素材としての機能が高ければ使用量を少なくすることができるため, 最終製品の価格を上げることなく使用することが期待できる. たとえば, BSの場合, 界面活性剤としての機能は石油由来のものに比べて極少量で発揮できる. さらに, 石油由来製品にはない特性を有することもBSの大きな特徴の一つである.

MELは, スキンケア素材としての実用特性から化粧品への応用に成功したが, その他にもさまざまな優れた生理機能を有するため, 構造と機能の多様化をさらに継続していくことで, その用途拡大が可能になると考えられる. より多様な同族体を安価に大量製造できれば, 低価格帯の製品への応用も視野に入るため, 部分的に合成界面活性剤との代替も可能になるかもしれない. 今後, ゲノム情報や遺伝子組換え技術によって *Pseudozyma* 属の育種・改良が進み, MELの構造制御や生産効率の大幅な向上が可能になれば, MELの普及拡大によって幅広い産業への貢献が期待される.

文 献

- 1) 北本 大: オレオサイエンス, **3**, 663 (2003).
- 2) Kitamoto, D. *et al.*: *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.*, **14**, 315 (2009).
- 3) Morita, T. *et al.*: *Biotechnol. Appl. Biochem.*, **53**, 39 (2009).
- 4) Morita, T. *et al.*: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **97**, 4691 (2013).
- 5) Hewald, S. *et al.*: *Appl. Environ. Microbiol.*, **72**, 5469 (2006).
- 6) Morita, T. *et al.*: *PLoS One*, **9**, e86490 (2014).
- 7) Morita, T. *et al.*: *Genome Announc.*, **1**, e0006413 (2013).